

**Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang -  
Bagian 4: Metabolit *Furazolidone* (AOZ)**





© BSN 2010

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	3
5 Bahan .....	3
6 Prosedur kerja .....	4
7 Perhitungan hasil.....	5
8 Pengendalian mutu.....	5
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan.....	6
Lampiran B (normatif) Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AOZ.....	8
Lampiran C (normatif) Posisi standar AOZ dan contoh pada well dan kurva kalibrasi standar AOZ .....	9
Bibliografi .....	10
Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AOZ.....	8
Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar AOZ .....	9
Tabel C.1 – Susunan standar AOZ dan contoh dalam well.....	9



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 4 Metabolit *Furazolidone* (AOZ).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus SPT 65-05-S2 Perikanan Budidaya pada tanggal 14 September 2009 di Bandung, dihadiri oleh anggota subpanitia teknis, wakil-wakil dari unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
5. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.01/Men/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
6. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.02/Men/2007 tentang Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologis dan Pencemaran Pada Pembudidayaan Ikan.
7. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 07/DPB/HK.150.154/S4/VII/2007 tentang Batas Maksimum Residu Obat Ikan, Peptisida dan Kontaminan Pada Bahan Makanan Yang Berasal Dari Ikan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. No. 06/DPB/HK.150/S4/VII/2007 tentang Pedoman Pelaksanaan Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Desember 2009 sampai dengan 22 Pebruari 2010 dengan hasil akhir RASNI.



## Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 4: Metabolit *Furazolidone* (AOZ)

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur pengujian residu antibiotik Metabolit *Furazolidone* (AOZ) pada ikan dan udang dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA).

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **absorbansi**

penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada ELISA reader

#### 2.2

##### **antibiotik**

zat kimia dengan sifat antimikroba, dihasilkan oleh mikroorganisme, tumbuhan, atau hewan yang lebih tinggi dan juga secara sintetik

#### 2.3

##### **antibodi**

molekul *immunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari seri limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

#### 2.4

##### **antigen**

benda asing yang menyebabkan pembentukan antibodi bila dimasukkan ke dalam organisme. Antigen bisa berupa toksin dari bakteri, enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

#### 2.5

##### **AOZ**

*3-amino-2-oxazolidinone* merupakan metabolit dari *furazolidone*

#### 2.6

##### **contoh ikan dan udang**

sejumlah kecil dari suatu populasi ikan/udang yang digunakan untuk pemeriksaan dan memenuhi persyaratan secara statistika

#### 2.7

##### ***dilution factor***

faktor pengenceran yang diperoleh dari penambahan volume larutan pengencer

**CATATAN** Faktor  $x$  didapat dari berat sampel dibagi dengan volume *ethyl acetate* yang ditambahkan dan dikalikan dengan volume lapisan bagian atas *ethyl acetate* yang dipindahkan.

#### 2.8

##### **ekstraksi**

proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur



**2.9**

**enzim**

protein yang bertindak sebagai katalis biologis berfungsi mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme

**2.10**

**enzyme linked immunoassay (ELISA)**

teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada suatu contoh daging dari ikan/udang

**2.11**

**evaporasi**

proses penguapan yaitu proses perubahan molekul zat cair menjadi gas atau uap air

**2.12**

**extraction buffer**

larutan *buffer* untuk mengekstraksi senyawa analit dari contoh daging ikan/udang

**2.13**

**inkubasi**

pemeliharaan organisme, campuran reaksi, dan semacamnya dalam lingkungan temperatur yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu agar tercapai hasil/akibat tertentu

**2.14**

**metabolit**

substansi yang memiliki ukuran molekul kecil yang merupakan produk antara maupun akhir dari suatu proses metabolisme dan pada umumnya, produk tersebut masih tetap ada pada saat akhir metabolisme

**2.15**

**sentrifus**

alat untuk mengendapkan partikel dengan berat molekul rendah dengan cara pemutaran pada kecepatan tinggi

**2.16**

**stop buffer**

larutan *buffer* untuk menghentikan reaksi enzim

**2.17**

**TMB substrate**

larutan 3,3',5,5' Tetramethyl benzidine

**2.18**

**well**

lubang sumuran pada *microtiter plate* yang berisi antigen

**3 Prinsip**

Metode *screening* ini berdasarkan pengukuran kompetitif kolorimetrik ELISA. Bahan atau metabolit antibiotik yang akan diukur telah dilapiskan pada sumuran di *microtiter plate*. Selama analisa berlangsung, contoh ditambahkan bersamaan dengan antibodi spesifik dari antibiotik atau metabolit yang akan diuji. Apabila material atau metabolit target terdapat dalam contoh uji maka material tersebut akan bersaing dengan antibodi dan dengan cara tersebut akan mencegah antibodi terikat pada material atau metabolit yang telah terikat pada



sumuran *microtiter plate*. Antibodi sekunder, yang telah ditandai dengan enzim peroksidase, akan berikatan dengan antibodi *primer* yang telah terkompleksitas pada material atau metabolit yang telah ada pada sumuran *microtiter plate*. Setelah penambahan substrat, intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding terbalik dengan konsentrasi material atau metabolit yang diuji pada contoh.

#### 4 Peralatan

- a) blender;
- b) *erlenmeyer*;
- c) evaporator (*nitrogen evaporator*);
- d) *freezer*;
- e) gelas ukur;
- f) inkubator;
- g) *micropipette* (20  $\mu$ l sampai dengan 200  $\mu$ l dan 200  $\mu$ l sampai dengan 1000  $\mu$ l);
- h) *micropipette multichannel*;
- i) *microtiter plate reader* /ELISA reader (450 nm/630 nm);
- j) *mini mixer*;
- k) pengaduk magnetik;
- l) pipet dispenser;
- m) pipet volumetrik;
- n) sentrifus;
- o) tabung reaksi;
- p) tabung sentrifus;
- q) timbangan analitik;
- r) *waterbath*.

#### 5 Bahan

##### 5.1 Bahan kimia

- a) akuabides;
- b) *ethyl acetate* G.R;
- c) HCl G.R;
- d)  $K_2 HPO_4$  G.R;
- e) NaOH G.R;
- f) Nitrogen H.P (*High Purity*);
- g) *n – Hexane* G.R.

##### 5.2 Bahan ELISA kits

- a) *antibody #2 diluent*;
- b) *AOZ antibody #1*;
- c) *HRP-conjugated antibody #2* 100 x;
- d) *microtiter plate* yang telah dilapisi oleh antigen AOZ;
- e) 2-Nitrobenzaldehyde 50 mM;
- f) larutan standar AOZ (0; 0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 4,5) ng/ml;
- g) 10x *sample extraction buffer*;
- h) 20x *wash solution*;
- i) *stop buffer*;
- j) *TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) substrate*.

**CATATAN** Pembuatan larutan diuraikan dalam Lampiran A.



## 6 Prosedur kerja

### 6.1 Preparasi contoh daging ikan/udang

- lumatkan contoh ( $\pm$  250 gram) dengan blender hingga homogen;
- simpan contoh yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup;
- jika contoh tidak langsung diuji maka simpan dalam *freezer* sampai analisa akan dilakukan.

### 6.2 Ekstraksi

- Timbang 1 gram homogenat contoh ke dalam tabung sentrifus 50 ml dan tambahkan dengan 0,5 ml 1x *sample extraction buffer*; 3,5 ml akuabides; 0,5 ml HCl 1 M; dan 20  $\mu$ l 2-Nitrobenzaldehyde 50 mM.
- Kocok campuran di atas selama 30 detik dengan menggunakan *mini mixer*.
- Inkubasikan pada suhu 50 °C selama tiga jam dan kocok selama 5 detik setiap 30 menit dengan menggunakan *mini mixer* selama inkubasi.
- Tambahkan 5 ml  $K_2HPO_4$  0,1 M; 0,4 ml NaOH 1 M; dan 6 ml *ethyl acetate* lalu kocok dengan menggunakan *mini mixer* selama 30 detik.
- Sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 6000 rpm (4.025 g, r=10 cm).
- Pindahkan 3 ml *ethyl acetate* (lapisan atas) (lebih kurang sama dengan 0,5 gram contoh asli) ke dalam tabung reaksi yang baru.
- Apabila terjadi lapisan emulsi sehingga *ethyl acetate* (lapisan atas) kurang dari 3 ml maka inkubasi kembali contoh dalam *waterbath* selama 3 menit pada suhu 85 °C.
- Keringkan contoh atau lapisan bagian atas *ethyl acetate* dengan menggunakan *nitrogen evaporator* pada suhu 60 °C.
- Larutkan endapan contoh yang sudah kering dengan 1 ml *n-Hexane*.
- Tambahkan 1 ml 1x *sample extraction buffer* dan kocok selama 2 menit dengan menggunakan *mini mixer*.
- Sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 6000 rpm (4.025 g, r=10 cm).
- Buang lapisan atas kemudian ambil 50  $\mu$ l lapisan *buffer* (lapisan bawah) untuk analisa ELISA.

**CATATAN** Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh digambarkan pada Lampiran B.

### 6.3 Proses pengujian ELISA

- Masukkan 50  $\mu$ l masing-masing larutan standar AOZ ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah sampai dengan konsentrasi tertinggi (Tabel C.1).
- Masukkan 50  $\mu$ l masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula.
- Tambahkan 100  $\mu$ l AOZ *antibody* #1 dan campurkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual selama 1 menit.
- Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup selama 30 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- Buang cairan dari dalam *well* sampai benar-benar kering dengan cara mengetukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu sehingga cairan dalam *well* keluar semua.
- Cuci *well* dengan 250  $\mu$ l 1x *wash solution* sebanyak tiga kali.
- Setelah pencucian terakhir, balikkan *microtiter plate* dan ketukkan pada alas yang dilapisi oleh kertas tisu serta jangan biarkan *microtiter plate* mengering.
- Tambahkan 150  $\mu$ l 1x *antibodi* #2.
- Inkubasikan *microtiter plate* dalam kondisi tertutup selama 30 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).



- j) Ulangi langkah e dan f.
- k) Tambahkan 100 µl *TMB substrate* pada setiap *well* dan campur dengan cara menggoyang *microtiter plate* secara manual selama 1 menit.
- l) Inkubasikan selama 15 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C) dengan kondisi *microtiter plate* tertutup.
- m) Tambahkan 100 µl larutan *stop buffer*.
- n) Baca absorbansi setiap sumuran dengan *microtiter plate reader* (ELISA reader) pada panjang gelombang 450 nm dengan segera (tidak lebih dari 30 menit).

**CATATAN** Posisi standar AOZ dan contoh pada *well* digambarkan pada Lampiran C.1.

## 7 Perhitungan hasil

- a) Kurva kalibrasi standar AOZ dapat dibuat dari pembacaan % absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva logaritma.
 
$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{\text{Absorbansi standar atau contoh}}{\text{Absorbansi standar 0 ng/ml}} \times 100 \%$$
- b) Masukkan hasil pembacaan % absorbansi contoh ke dalam kurva kalibrasi standar (Gambar C.1).
- c) Nilai konsentrasi AOZ pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan *dilution factor*.

**CATATAN** Kurva kalibrasi standar AOZ digambarkan pada Lampiran C.2.

## 8 Pengendalian mutu

Pengendalian mutu yang digunakan dengan persyaratan sebagai berikut:

- a) bahan kimia berkualitas murni (*Grade Reagent (GR)*);
- b) alat gelas bebas kontaminasi;
- c) alat ukur yang telah dikalibrasi;
- d) menyimpan bahan ELISA kit pada lemari pendingin dengan suhu 2 °C sampai dengan 8 °C;
- e) kondisikan ELISA kit pada suhu kamar selama 30 menit sampai dengan 1 jam sebelum digunakan;
- f) gunakan bahan analisa sebelum batas waktu kedaluwarsa.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan larutan**

**A.1 Larutan *dipotassium hidrogen fosfat*,  $K_2HPO_4$  0,1 M**

Bahan:

- $K_2HPO_4$  G.R 1,7418 g
- akuabides 100 ml

Cara membuat:

Larutkan 1,7418 g  $K_2HPO_4$  G.R dalam 100 ml akuabides.

**A.2 Larutan *asam klorida*, HCl 1 M**

Bahan:

- HCl G.R (konsentrasi 37 %) 8,6 ml
- akuabides 91,4 ml

Cara membuat:

- Pipet 8,6 ml HCl G.R (konsentrasi 37 %) dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml yang berisi 25 ml akuabides.
- Tepatkan volume menjadi 100 ml dengan akuabides.

**A.3 Larutan *natrium hidroksida*, NaOH 1 M**

Bahan:

- NaOH G.R 4 g
- akuabides 100 ml

Cara membuat:

Larutkan 4 g NaOH G.R dalam 100 ml akuabides.

**A.4 1x *antibody* #2**

Bahan:

- HRP-conjugated antibody #2 100 x
- antibody #2 diluent

Cara membuat:

Encerkan HRP-conjugated antibody #2 100 x dan antibody #2 diluent dengan perbandingan volume 1 : 99.



**A.5 1x sample extraction buffer**

Bahan:

- 10x *sample extraction buffer*
- akuabides

Cara membuat :

Encerkan 10x *sample extraction buffer* dengan akuabides dengan perbandingan volume 1 : 9.

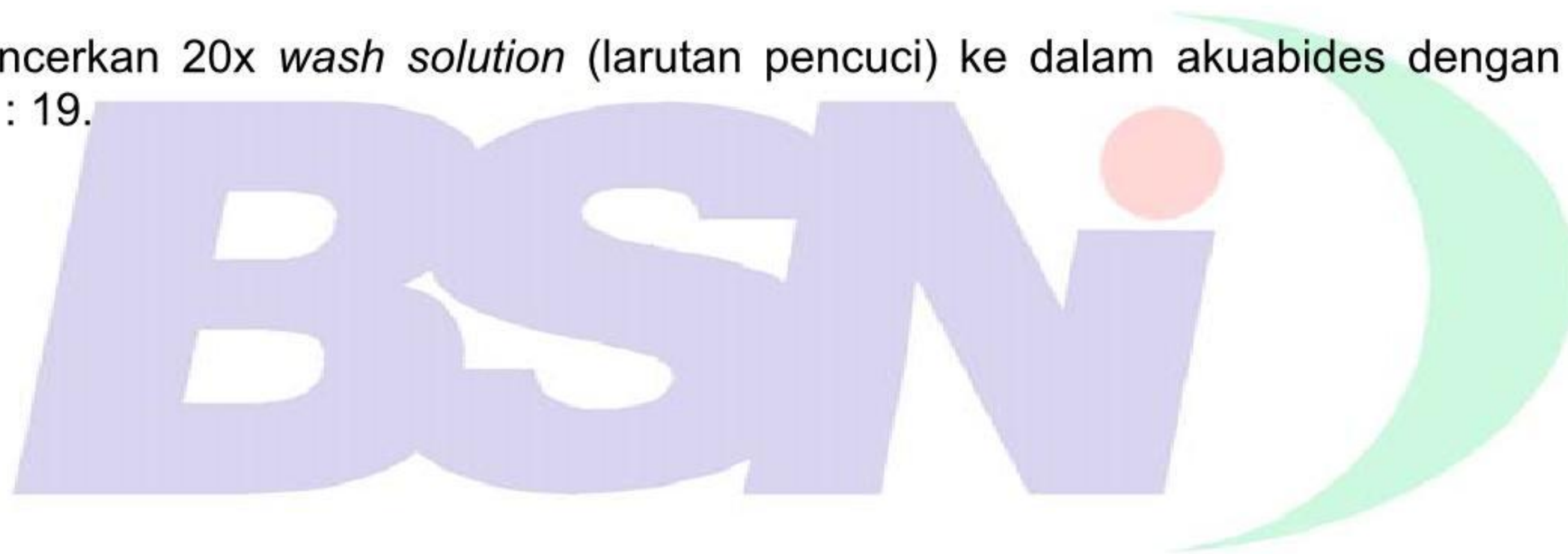
**A.6 1x wash solution**

Bahan:

- 20x *wash solution*
- akuabides

Cara membuat :

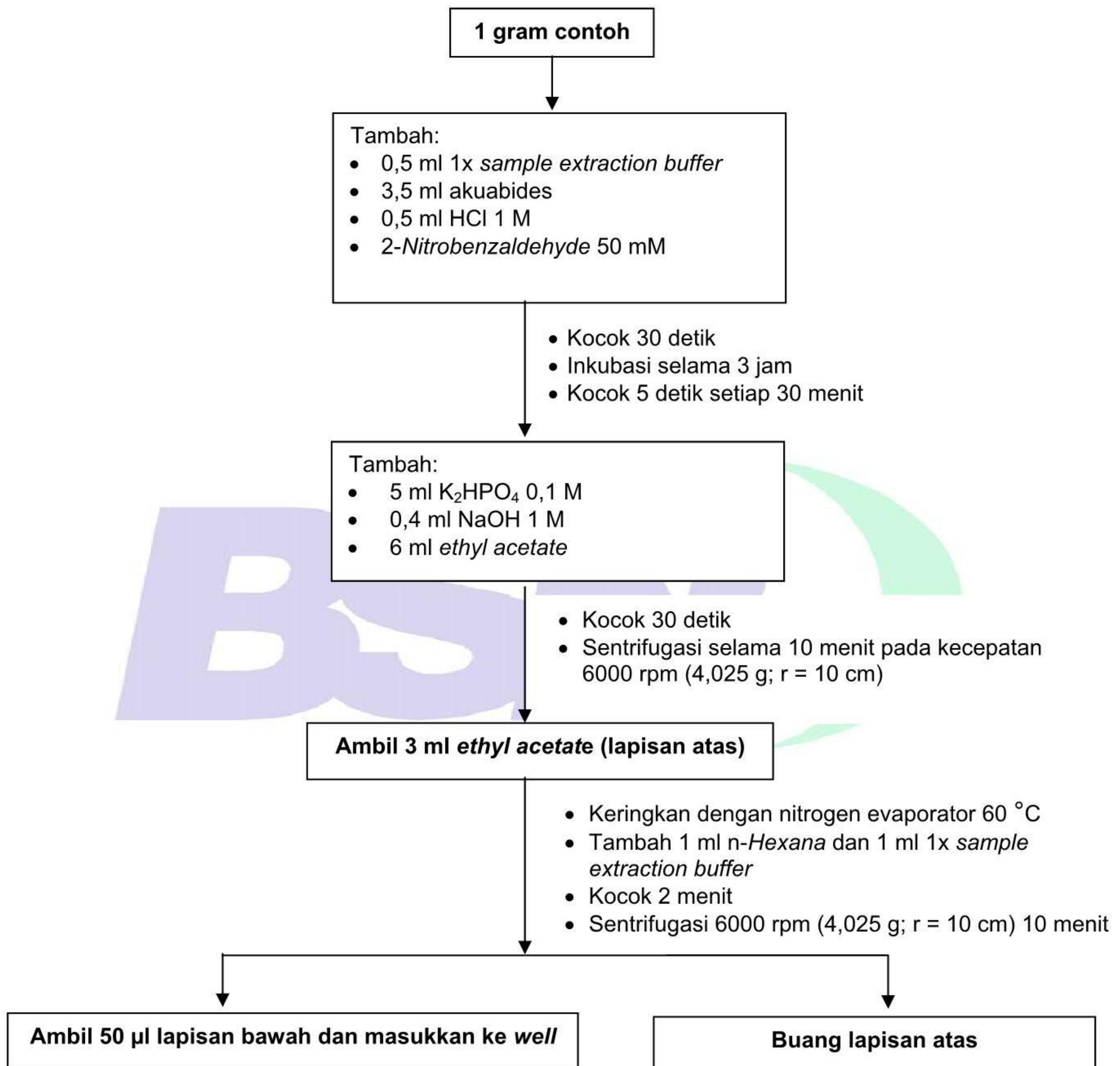
Encerkan 20x *wash solution* (larutan pencuci) ke dalam akuabides dengan perbandingan 1 : 19.





**Lampiran B**  
(normatif)

**Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AOZ**



**Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AOZ**



Lampiran C  
(normatif)  
Posisi standar AOZ dan contoh pada well dan kurva kalibrasi standar AOZ

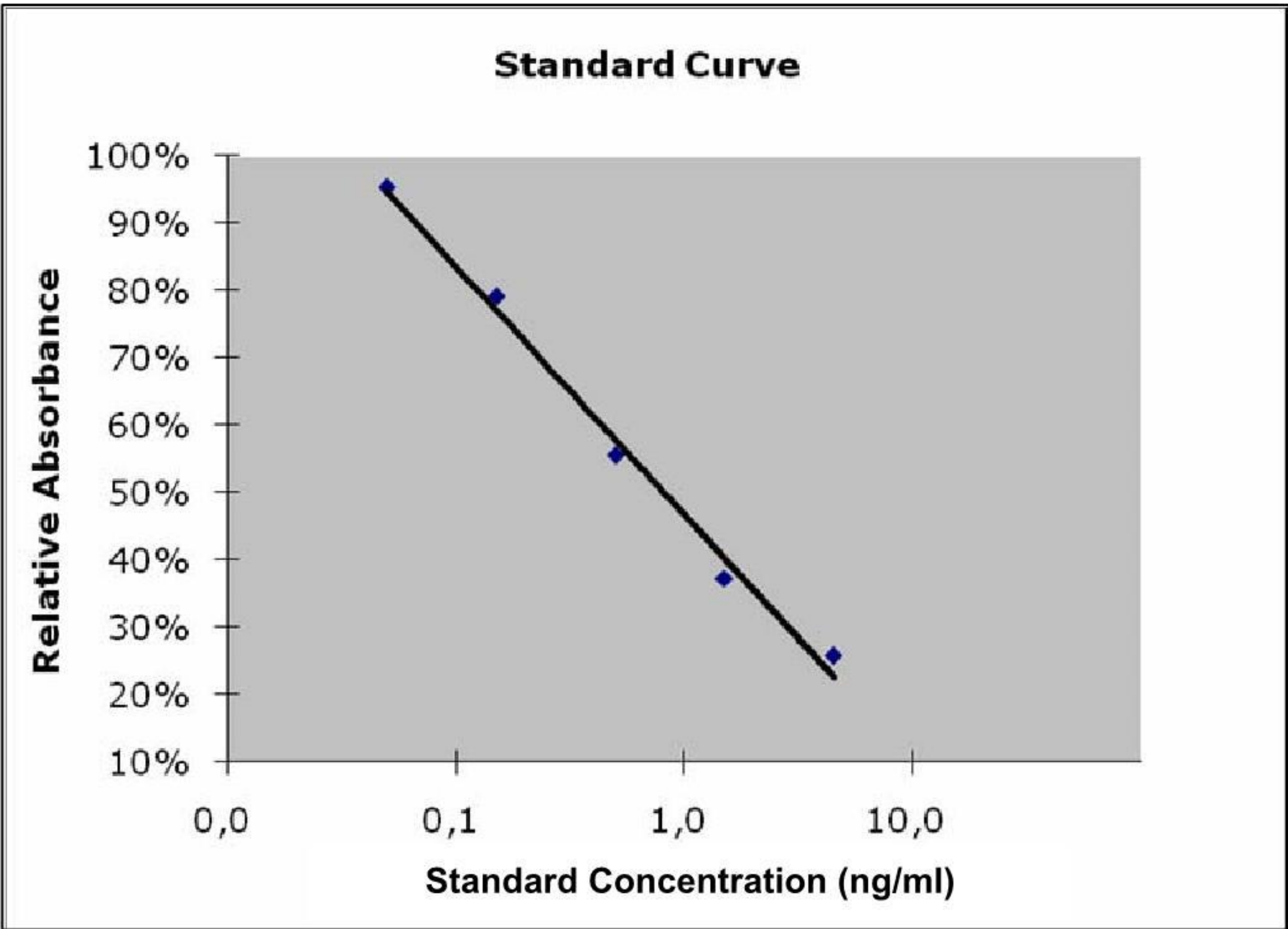
C.1 Posisi standar AOZ dan contoh pada well

Tabel C.1 – Susunan standar AOZ dan contoh dalam well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S-0	S-1,5	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
B	S-0	S-1,5	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
C	S-0,05	S-4,5	C-4	C-8	C -12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
D	S-0,05	S-4,5	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
E	S-0,15	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
F	S-0,15	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
G	S-0,5	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42
H	S-0,5	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42

Keterangan :  
S : kode larutan standar AOZ (0; 0,05; 0,15; 0,5; 1,5; 4,5) ng/ml;  
C : kode larutan contoh (C1 – C42)  
Lajur A-H : posisi well vertikal  
Lajur 1-12 : posisi well horisontal

C.2 Kurva kalibrasi standar AOZ



Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar AOZ



## Bibliografi

MaxSignal™ *Furazolidone* (AOZ) ELISA Test Kit Manual.

Franek, M., I. Diblikova, M. Vass, L. Kotkova, K. Stastny, K. Frgalova dan K. Hruska. 2006. *Validation of a monoclonal antibody-based ELISA for the Quantification of the furazolidone metabolite(AOZ) in eggs using various sample preparation*. Veterinarni Medicina, 51(5): 248-257.

Vass, M., L. Kotkova, I. Diblikova, Z. Nevorankova, K.M. Cooper, D.G. Kennedy dan M. Franek. 2005. *Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone*. Vet. Med. - Czech, 50(7): 300-310.











**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)